

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-243591

(43)公開日 平成9年(1997)9月19日

(51)Int.Cl.⁶
G 0 1 N 27/327

識別記号

府内整理番号

F I

G 0 1 N 27/30

技術表示箇所

3 5 3 R

3 5 3 U

3 5 3 B

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全6頁)

(21)出願番号 特願平8-55925

(22)出願日 平成8年(1996)3月13日

(71)出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 宮本 佳子

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

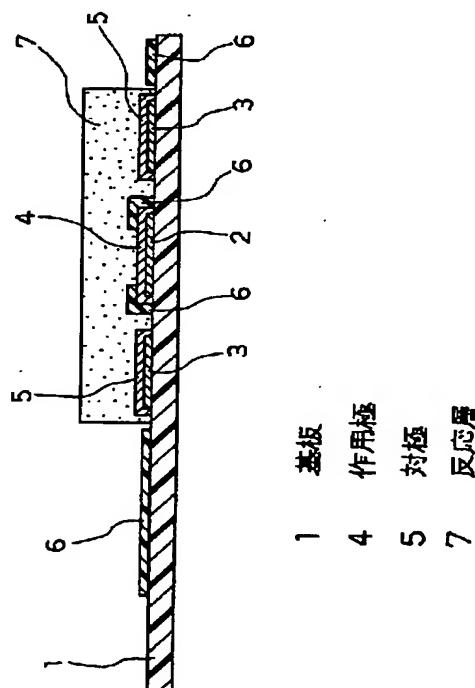
(74)代理人 弁理士 東島 隆治 (外1名)

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【課題】 試料液中に共存する基質以外の成分、例えばpHを変化させるものや赤血球などの粒子状の成分、による影響のない高性能なバイオセンサを提供することを目的とする。

【解決手段】 電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上に配置された親水性高分子と酵素と電子受容体を含有する反応層を具備し、前記反応層の親水性高分子の量を、酵素の重量の150%から1000%の範囲としたバイオセンサ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極および対極を有する電極系、および前記電極系上に配置された親水性高分子と酵素と電子受容体を含有する反応層を具備し、前記反応層の親水性高分子の量が、酵素の重量の150%から1000%の範囲であることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 親水性高分子が、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシエチルメチルセルロース、アミロース、およびでんぶんからなる群より選ばれる請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 酵素が、グルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、およびビリルビンオキシダーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種である請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項4】 反応層が、親水性高分子を含む第1層と、親水性高分子と酵素と電子受容体を含有する第2層からなる請求項1記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料中の特定成分について、迅速かつ高精度な定量を実施するためのバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量する方式として様々な様式のバイオセンサが開発されている。酵素反応を利用したバイオセンサは、酵素反応系を担持または含有した担体を用い、信号の伝達方法として光、色、電気信号などが用いられる。なかでも電気信号を用いるバイオセンサは、電気絶縁性の基板上にスクリーン印刷などの方法で作用極および対極からなる電極系を形成し、さらに電気絶縁層を形成した後に、上記電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体からなる酵素反応層を形成したものがある（特開平3-202764号公報）。測定対象物質としての基質を含む試料液を酵素反応層上へ滴下すると、酵素反応層が溶解し、基質と酵素が反応して基質が酸化され、これに伴い電子受容体が還元される。酵素反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めるものである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上記のような従来構成のバイオセンサにおいては、試料液の基

質濃度が同じ場合でも、試料液に含まれる基質以外の成分の存在によって、センサの応答特性に差が出るという課題を有していた。例えば、pHを変化させるものが存在するために酵素の活性が変化し、センサの応答特性に差が出るということがあった。また、血液を試料とする場合などでは、赤血球などの粒子状の成分が含まれ、これらの含有量が異なることによって、センサの応答特性に差があった。このような試料液の性状の差を緩和する方法として、一定の希釈液を用いて希釈し、それぞれの性状の差を小さくする方法も有効であるが、使い勝手からすると必ずしも得策ではない。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明のバイオセンサは、電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上に配置された親水性高分子と酵素と電子受容体を含有する反応層を具備し、前記反応層の親水性高分子の量を、酵素の重量の150%から1000%の範囲としたものである。ここで、親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシエチルメチルセルロースなどのセルロースエーテル、アミロース、およびでんぶんからなる群より選ばれる。

【0005】 また、酵素は、グルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、およびビリルビンオキシダーゼからなる群より選ばれる。反応層は、親水性高分子を含む第1層と、親水性高分子と酵素と電子受容体を含有する第2層から構成するのが好ましい。また、第1層の親水性高分子は、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、およびカルボキシエチルメチルセルロースからなる群より選ばれるものが好ましい。

【0006】

【発明の実施の形態】 以下、本発明の実施の形態を説明する。図1は本発明のバイオセンサの、カバーおよびスペーサーを除いた断面模式図である。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3を形成し、さらに、同様の印刷法により、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストからなる作用極4と対極5を含む電極系および電気絶縁性ペーストからなる電気絶縁層6を形成する。電気絶縁層6は、作用極4および対極5の露出部分の面積を一定とし、かつリード2、3を部分的に覆っている。

【0007】 このようにして電極部分を形成した後に、

親水性高分子としてカルボキシメチルセルロース（以下CMCと略す）の水溶液を電極系表面に滴下し、乾燥させて第1層を形成する。この第1層の上に、酵素と電子受容体と親水性高分子の混合水溶液を滴下し、乾燥させて、親水性高分子、酵素および電子受容体を含む第2層を形成する。こうして第1層および第2層からなる反応層7を形成する。前記のように、第1層上に、親水性高分子、酵素、電子受容体の混合水溶液を滴下すると、最初に形成した第1層は一度溶解し、その後の乾燥過程で酵素などと混合された状態で親水性高分子、酵素、電子受容体からなる反応層7を形成する。しかし、攪拌を伴わないと完全な混合状態とはならず、電極系表面はCMCのみによって被覆された状態となる。この親水性高分子からなる第1層の存在により、電極系表面へのタンパク質の吸着などを防ぐことができる。

【0008】上記のようにして反応層を形成した後、カバー12およびスペーサー11を図2中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着することによりグルコースセンサが作製される。上記構成によるバイオセンサは、試料液のpHが異なるなどの性質による影響が親水性高分子の作用で緩和され、試料液中の基質以外の成分の含有およびその含有量が異なることによるセンサの応答特性の差を小さくすることができる。また、血液を試料としたときとグルコース水溶液を試料としたときで、ほぼ同一の応答値が得られる。これは、血液中の赤血球や血清タンパク質などが存在することによるセンサ反応への影響が緩和され、血球成分などの大きな粒子成分が反応層中に入り込むのが妨げられ、反応層表面でトラップされることによるものである。

【0009】反応層中の親水性高分子の混合量は、酵素の重量の150%から1000%の範囲で上記の効果が得られる。親水性高分子の量が酵素の量の150%未満の場合には、基質以外の成分の存在のセンサ応答への影響を緩和する効果が十分得られない。また、親水性高分子の量が酵素の量の1000%を越える場合には、反応層が試料液で溶解し難くなり、十分なセンサ応答値を得るために時間がかかり、応答値のばらつきが増大するという結果となる。

【0010】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明する。

《実施例1》バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。図1のように、ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上にリード2、3と作用極4、対極5を含む電極系および電気絶縁層6を形成する。このようにして電極部分を形成した後に、親水性高分子としてカルボキシメチルセルロース（以下CMCと略す）の0.25wt%水溶液を電極系表面に滴下し、50℃の温風乾燥機中で10分間乾燥させて第1層を形成した。この第1層の上に、酵素としてグルコースオキシダーゼ（EC1.1.3.4；以下G

ODと略す）10mg、電子受容体としてのフェリシアン化カリウム16mg、および親水性高分子としてCMC20mgを水1mlに溶解した混合水溶液を滴下し、50℃の温風乾燥機中で10分間乾燥させて、親水性高分子、酵素および電子受容体を含む反応層7を形成した。この反応層の第1層と第2層を合わせた親水性高分子CMCの量は、重量比でグルコースオキシダーゼの231%である。

【0011】上記のようにして反応層を形成した後、カバー12およびスペーサー11を図2中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着してグルコースセンサを作製した。このグルコースセンサの試料液として、グルコース濃度が0～800mg/dlのグルコース溶液を純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いてそれぞれ調製した。試料液3μlを試料供給孔となるスペーサーのスリット13の開口部より供給すると、試料液はスリット13により形成される試料供給路を空気孔14の部分まで達し、反応層7に試料液が浸透して反応層7が溶解する。反応層7で試料液中のグルコースがグルコースオキシダーゼによって酸化され、そこで移動した電子によってフェリシアン化カリウムが還元されてフェロシアノ化カリウムを生じる。

【0012】このようにして生じたフェロシアノ化カリウムが電極表面近傍に移動し、試料を供給してから1分後に、電極系の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定したところ、純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液のグルコース濃度に依存する値が得られた。純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、ほぼ同じであった。また、このグルコースセンサの試料液として血液を用意し、試料を供給してから1分後に、電極系の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定したところ、血液試料中のグルコース濃度に依存する値が得られた。血液試料におけるグルコース濃度に対する電流応答値は同濃度のグルコース水溶液に対する電流応答値の約98%であった。

【0013】《比較例1》反応層の第2層を形成する際の酵素と電子受容体の混合溶液中に親水性高分子を含まない他は、実施例1と同じ構成のセンサを作製した。反応層中第1層に含まれるCMCの量は、重量比でグルコースオキシダーゼの31%である。このセンサを用いた場合には、pH5の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、純水で調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値とほぼ同じであったが、pH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製

したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、純水で調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値の約60～70%であり、電流応答値とグルコース濃度との間に直線関係が得られなかった。また、血液試料におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、同濃度の純水で調製したグルコース溶液に対する電流応答値の約70～80%であった。このように、電流応答値が低いことが、S/N比を増大させ、センサの測定精度を低下させる原因となるとともに、血液のヘマトクリット値の個体間差が、センサの電流応答値に影響する原因となる。

【0014】《実施例2》実施例1と同様にして、ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上にリード2、3と作用極4、対極5を含む電極系および電気絶縁層6を形成した。さらに、実施例1と同様にして、親水性高分子からなる第1層を形成した上に、ヒドロキシエチルセルロース50mg、GOD10mg、およびフェリシアン化カリウム16mgを水1mlに溶解した溶液を用いて、親水性高分子、酵素および電子受容体からなる反応層7を形成した。この反応層の第1層と第2層を合わせた親水性高分子の量は、重量比でグルコースオキシダーゼの531%である。さらに、実施例1と同様にカバー12およびスペーサー11とともに一体化してグルコースセンサを作製した。

【0015】このグルコースセンサの試料液として、グルコース濃度が0～800mg/dlのグルコース溶液を純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いてそれぞれ調製した。実施例1と同様に、試料液3μlを試料供給孔より供給してから1分後に、電極系の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定したところ、純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液のグルコース濃度に依存する値が得られた。純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、ほぼ同じであった。また、このグルコースセンサの試料液として血液を用意し、試料を供給してから1分後に、電極系の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定したところ、血液試料中のグルコース濃度に依存する値が得られた。血液試料におけるグルコース濃度に対する電流応答値は同濃度のグルコース水溶液に対する電流応答値の約96%であった。

【0016】《比較例2》実施例1と同様にして、親水性高分子からなる第1層を形成した上に、ヒドロキシエチルセルロース12mg、GOD10mg、およびフェリシアン化カリウム16mgを水1mlに溶解した溶液を用いて、親水性高分子、酵素および電子受容体からな

る反応層7を形成した。この反応層の第1層と第2層を合わせた親水性高分子の量は、重量比でグルコースオキシダーゼの131%である。さらに、実施例1と同様にカバー12およびスペーサー11とともに一体化してグルコースセンサを作製した。

【0017】実施例1と同様に、試料液3μlを試料供給孔13より供給してから1分後に、電極系の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定した。その結果、純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したそれぞれのグルコース溶液のグルコース濃度に依存する値が得られた。しかし、pH5の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、純水で調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値とほぼ同じであったが、pH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、純水で調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値の約60～70%で、電流応答値とグルコース濃度の間に直線関係が得られなかった。また、血液試料におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、同濃度の純水で調製したグルコース溶液に対する電流応答値の約75～85%であった。このように、電流応答値が低いことが、S/N比を増大させ、センサの測定精度を低下させる原因となるとともに、血液のヘマトクリット値の個体間差が、センサの電流応答値に影響する原因となる。

【0018】《実施例3》実施例1と同様にして、親水性高分子からなる第1層を形成した上に、GOD10mg、フェリシアン化カリウム16mg、およびカルボキシエチルセルロース20mgを水1mlに溶解した溶液を用いて、親水性高分子、酵素および電子受容体からなる反応層7を形成した。この反応層の第1層と第2層を合わせた親水性高分子の量は、重量比でグルコースオキシダーゼの231%である。

【0019】このグルコースセンサの試料液として、グルコース濃度が0～800mg/dlのグルコース溶液を純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いてそれぞれ調製した。実施例1と同様に、試料液3μlを試料供給孔13より供給してから1分後に、電極系の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定したところ、純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液のグルコース濃度に依存する値が得られた。純水、pH5の100mMのリン酸緩衝液、およびpH7の100mMのリン酸緩衝液を用いて調製したグルコース溶液におけるグルコース濃度に対する電流応答値は、ほぼ同じであった。また、このグルコ-

センサの試料液として血液を用意し、試料を供給してから1分後に、電極系の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定したところ、血液試料中のグルコース濃度に依存する値が得られた。血液試料におけるグルコース濃度に対する電流応答値は同濃度のグルコース水溶液に対する電流応答値の約97%であった。

【0020】なお、上記実施例ではグルコースセンサについて示したが、本発明はアルコールセンサ、スクロースセンサ、コレステロールセンサ、乳酸センサやフルクトースセンサなどの酵素の関与する反応系を用いたバイオセンサに広く用いることができる。酵素としては、グルコースオキシダーゼに限定されることはなく、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼなども用いることができる。

【0021】さらに、上記実施例では、第1層の親水性高分子層が電極系表面へのタンパク質の吸着などを防ぐことを示したが、実施例中で用いたCMC以外に、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、ヒドロキシプロビルセルロース、カルボキシエチルメチルセルロースなどのセルロースエーテルを用いても同様の効果が得られる。さらに、上記実施例では、第2層に含まれる親水性高分子としてCMC、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロースを用いたが、これらに限定することなくヒドロキシプロビルセルロース、カルボキシエチルメチルセルロースなどのセルロースエーテルを用いても良く、また、アミロース、でんぶんおよびその誘導体を用いても同様の効果が得られる。

【0022】一方、電子受容体としては、上記実施例に示したフェリシアン化カリウム以外に、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、インドフェノールお

よびその誘導体、β-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウム、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体なども使用できる。これらの親水性高分子、酵素、電子受容体を溶解する溶媒として、上記実施例では水を用いたが、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液などの各種緩衝液を用いることもできる。また、上記実施例において酵素および電子受容体については試料液に溶解する方式について示したが、これに制限されることはなく、固定化によって試料液に不溶化させた場合にも適用することができる。さらに、反応層の上にレシチンを含む層を形成することで、試料の導入をスムーズにことができる。また、上記実施例では、作用極と対極のみの二極電極系について述べたが、参照極を加えた三電極方式にすれば、より正確な測定が可能である。

【0023】

【発明の効果】以上のように本発明によると、試料液中に共存する基質以外の成分の影響を受けず、高精度な定量が可能なバイオセンサを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

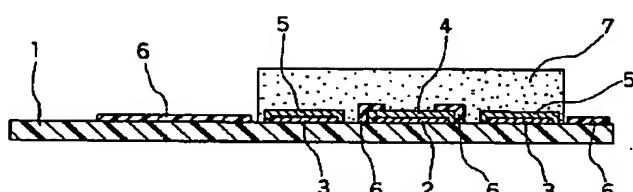
【図1】本発明によるグルコースセンサのカバーおよびスペーサーを除いた断面模式図である。

【図2】同グルコースセンサのうち、反応層を除いた分解斜視図である。

【符号の説明】

- 1 電気絶縁性の基板
- 2、3 リード
- 4 作用極
- 5 対極
- 6 電気絶縁層
- 7 反応層
- 11 スペーサー
- 12 カバー
- 13 スリット
- 14 空気孔

【図1】



- 1 基板
- 4 作用極
- 5 対極
- 7 反応層

【図2】

